

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM EDUCAÇÃO FÍSICA

ARTUR JUNIO TOGNERI FERRON

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA
DO SISTEMA β -ADRENÉGICO MIOCÁRDICO**

VITÓRIA
2014

ARTUR JUNIO TOGNERI FERRON

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA
DO SISTEMA β -ADRENÉGICO MIOCÁRDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física, Centro de Educação Física e Desportos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo.

VITÓRIA
2014

ARTUR JUNIO TOGNERI FERRON

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA DO SISTEMA β -ADRENÉGICO MIOCÁRDICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo
Orientadora

Profa. Dra. Márcia Regina de Holanda Cunha

Prof. Dr. Edson Castardeli

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira(Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

Aos meus Pais

Representam minhas raízes, minha base; fé, força de vontade, trabalho e dignidade, ensinamentos que estarão sempre comigo e fazem parte do caráter. Amor eterno!

Ao meu irmão, Renato,

Privilégio de ter o mesmo sangue que você, não existem palavras que possam representar o quanto me orgulho e admiro de você. Irmão, pai, mas, sobretudo, o melhor amigo e exemplo de vida a ser seguido e reproduzido, sempre do meu lado, me incentivando e me guiando para verdadeiras conquistas, sem sua presença e seu apoio nada disso jamais seria possível. Amo você!

Aos meus amigos

Que compreenderam minha ausência sempre que estive longe, obrigada pelos constantes incentivos e torcida pelo meu futuro. Vocês são essenciais!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, *Prof^a. Dr^a. Ana Paula Lima Leopoldo*, por ser um exemplo profissional, por sempre instigar a busca pela excelência, pelas oportunidades acadêmicas, por ter me ensinado que ciência é árdua, requer abdicação, muitas horas de dedicação e um profundo comprometimento. Não poderia deixar de agradecer pela imensurável oportunidade de vida, esses anos de convivência de fato foram diferenciais na minha vida acadêmica e pessoal. Minha eterna gratidão!

À *Prof. Dr. André Soares Leopoldo*, por sempre me atender com atenção, paciência e dedicação. Obrigado por mostrar todos os dias de maneira exemplar o amor pela pesquisa, mesmo nas adversidades ter um olhar positivo e uma incansável vontade de que tudo dê certo, pela oportunidade de aprendizagem e pelo privilégio de sua co-orientação.

Ao *Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna*, pela oportunidade de trabalho e aprendizagem, por compartilhar de forma exemplar seus conhecimentos, suas experiências e a maneira íntegra de lidar com a vida, seu comprometimento e sua vontade de fazer o melhor sempre, são apaixonantes, o tempo de convívio com o senhor foi de aprendizados diários. Obrigado por sempre acreditar em nosso aprendizado e por estimular a busca de oportunidades científicas e de vida.

“Mobilizar é convocar vontades para atuar na busca de um propósito comum, essa mobilização ocorre quando um grupo de pessoas, uma comunidade, uma sociedade decide e age com objetivo comum, buscando cotidianamente, os resultados desejados por todos”.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa jamais seria possível sem a cooperação, colaboração e amizade de muitas pessoas. Muito obrigada a todos cujo apoio e amizade fizeram a diferença. O trabalho foi grande, mas, com ajuda de pessoas preciosas como vocês, foi permeado de aprendizados, esforços e também de alegrias e felicidade.

Aos amigos do laboratório e da pós-graduação: *Flor, Jhennifer Jhennifer(Kuxa), Graziele(pipoca), Edna, Vitão, Márcio, Bruno, Felipe, Joctan, Gisela, Vitor, Vanessa, Wagner, Alexandre Barroso, prof. Karine*. Obrigada por sempre estarem a disposição para uma conversa, uma almoço, um café, uma discussão, mas sobretudo por estarem ao meu lado, tornando o caminho menos íngreme.

Aos amigos da UNESP-Botucatu, que muito me ensinaram e compartilharam das minhas dificuldades e expectativas, no laboratório do *prof. Cicogna: Adriana, Danielle T., Loreta, Daniele V., Paula G., Paulinha F., Carol Adorni, Scarlet, Thiago Bruder, e prof. Dr. Silvio*. Dos demais laboratórios: *Fabiane, Sabrina, Maria Eugénia, Klismam, Renato, Ricardo, Priscila, Andréia, Aline, Luana, Mariana, Miriane, Maria Tereza, Fernanda, Regiane, Renan, Diego*. Obrigada por toda colaboração no desenvolvimento deste trabalho, convivência e amizade.

É imprescindível agradecer aos amigos e funcionários dos Laboratórios, UFES: *Sandra, Zenobia e dona Maria. Botucatu Experimental da Clínica Médica: José Carlos Georgete, Mário Bruno, Elenize, Camila, Corina, Carlos Roberto, Sueli Clara, Paulo Dionisio, Igor, Eduardo, Diego, Vick, Cristina, Arlindo, Danilo, De Lalla, Rogério, Ângelo, Sandra Fábio, Silmeri e Regina*. Obrigada pela cooperação, apoio e convivência, durante esta etapa.

Ao amigo *Dijon Henrique Salomé*, pelo companheirismo, pelos constantes ensinamentos, pela respeitável contribuição na realização deste trabalho. Obrigado por ser de um fato um amigo, tornando nossa adaptação mais fácil.

Aos professores *Dr.^a Marcia Regina Holanda da Cunha* e *Dr. Edson Castardeli* pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

A atenciosa e prestativa funcionária da pós-graduação: *Suziane Comério*. Obrigada pelo carinho com que nos recebe e auxilia em todos os momentos.

A todos meus *AMIGOS* dos quais estive longe neste período, porém sempre com vocês no coração, nos pensamentos e nas histórias contadas. Sem a compreensão e o apoio de vocês este sonho jamais teria se concretizado.

À FAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição dos macro e micronutrientes das rações (%)	19
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa do sistema β -adrenérgico.....	15
Figura 2. Representação esquemática do acoplamento entre os receptores β adrenérgicos e a proteína $G_s\alpha$	16
Figura 3. Ponto de separação do índice de adiposidade.	19
Figura 4. Evolução do peso corporal	30
Figura 5. Perfil glicêmico	32
Figura 6. Níveis séricos de insulina.....	33
Figura 7. Índice de resistência à insulina.....	33
Figura 8. Níveis séricos de leptina	34
Figura 9. Expressão protéica receptor β -1	37
Figura 10. Expressão protéica receptor β -2	38
Figura 11. Expressão protéica $G_s\alpha$	38
Figura 12. Via de sinalização hipertrófica da insulina em cardiomiócitos	45
Figura 13. Via de sinalização hipertrófica da leptina em cardiomiócitos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil nutricional no momento inicial da obesidade	31
Tabela 2. Análise bioquímica.	31
Tabela 3. Perfil morfológico cardíaco <i>post mortem</i>	35
Tabela 4. Teor de água nos tecidos.	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Animais.....	18
2.2. Protocolo experimental.....	18
2.2.1. Composição das rações padrão e hipelipídica	19
2.3. Avaliação nutricional dos animais.....	20
2.4. Caracterização dos grupos	20
2.5. Obesidade e comorbidades	22
2.5.1 Hipertensão arterial sistêmica	22
2.5.2. Intolerância à glicose	22
2.5.3. Resistência sistêmica à insulina.....	23
2.5.4. Dislipidemias e hiperglicemia	23
2.5.5. Hiperinsulinemia e hiperleptinemia	24
2.6. Remodelação cardíaca	24
2.6.1. Perfil morfológico cardíaco	24
2.6.2 Análise do sistema β -adrenérgico.....	24
2.6.2.1. Western blot.....	24
2.6.2.2. Extração de proteínas.....	25
2.6.2.3. Eletroforese em gel.....	25
2.6.2.4. Transferência e identificação de proteínas	26
2.6.2.4.1. Anticorpos primários utilizados	27
2.6.2.4.2. Anticorpo de normalização.....	27
2.6.2.4.3. Anticorpos secundários.....	27
2.6.2.5. Quantificação das proteínas.....	27
2.7. Análise estatística	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Composição dos grupos.....	29
3.2. Evolução do peso corporal	29
3.3. Perfil nutricional	30
3.4. Perfil bioquímico	31
3.5. Pressão arterial sistólica.....	32

3.6. Perfil glicêmico	32
3.7. Níveis séricos de insulina	33
3.8. Índice de resistência a insulina	33
3.9. Níveis séricos de leptina	34
3.10. Perfil morfológico cardíaco	35
3.10.1. Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	36
3.11. Expressão das proteína dos sistema β -adrenérgico miocárdico.....	37
4. DISCUSSÃO.....	39
4.1. Constituição dos grupos controle e obeso	39
4.2. Momento inicial da obesidade	39
4.3. Perfil nutricional	40
4.4. Comorbidades.....	42
4.5. Remodelação cardíaca	44
4.5.1. Expressão das proteína dos sistema β -adrenérgico miocárdico	46
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença complexa caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo⁽¹⁾. A incidência e prevalência da obesidade no mundo têm aumentado progressivamente nas últimas década⁽²⁾, sendo considerada atualmente, uma epidemia global e um importante problema de saúde pública, que afeta tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento⁽³⁻⁵⁾. O número de indivíduos com sobrepeso atinge mais de um bilhão de pessoas no mundo, sendo que, mais de 30% desta população é obesa⁽⁶⁾. Apesar de ter sido acumulado até o momento um relativo conhecimento sobre a distribuição da obesidade, dentro do contexto da transição nutricional, muito ainda se faz necessário, sobretudo, no campo da prevenção e intervenção populacional⁽⁷⁾.

No Brasil, as mudanças demográficas, sócio-econômicas e epidemiológicas ao longo do tempo desencadearam a chamada transição nutricional, com diminuição progressiva da desnutrição e aumento da obesidade⁽⁸⁻¹⁰⁾. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística⁽¹¹⁾ aproximadamente 40 milhões de pessoas no Brasil apresentam sobrepeso e, deste grupo, 10,5 milhões são obesos. A previsão desta pesquisa aponta que 35% da população adulta brasileira será obesa em 2025, refletindo no aumento de custos e cuidados para a saúde pública⁽¹¹⁾.

Estudos que avaliaram as consequências da obesidade para a saúde humana têm mostrado que a etiologia da obesidade é complexa. Enquanto alguns autores sugerem que o fator genético pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, a maioria das pesquisas enfatizam que a prevalência desta doença na população ocorre devido aos chamados fatores ambientais, em especial, a dieta e o sedentarismo^(6,12). O aumento do consumo de energia, a redução na prática de atividade física ou a combinação de ambos têm levado ao balanço calórico positivo, com consequente aumento da gordura corporal⁽¹³⁾.

Dentro desse contexto, a obesidade se consolidou como agravo nutricional associado à alta incidência de morbidades, como alguns tipos de câncer, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e doenças cardiovasculares^(6,14,15), influenciando o perfil de mortalidade das populações, e, conseqüentemente, reduzindo a expectativa de vida⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

Pesquisas clínicas mostram que o excesso de gordura acarreta diversas anormalidades cardíacas, entre elas, alterações hemodinâmicas, morfológicas e funcionais, que se correlacionam com a duração e intensidade da obesidade^(21,22). Os distúrbios cardiovasculares mais frequentes observados na obesidade humana são hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana^(23,24). Os estudos que envolvem obesos humanos poderiam responder às diversas dúvidas em relação às disfunções cardiovasculares, mecanismos envolvidos e tratamentos clínicos. No entanto, estas pesquisas apresentam limitações éticas, financeiras e dificuldades no controle das variáveis que poderiam interferir nos resultados⁽²⁵⁾.

A obesidade experimental, utilizando modelos genéticos^(26,27) ou manipulações dietéticas⁽²⁸⁻³¹⁾, torna-se uma alternativa importante para o estudo da obesidade, comorbidades e mecanismos oriundos do excesso de gordura corporal. Dentro desse contexto, a obesidade por meio de dietas com alta densidade energética representa um modelo fidedigno e apropriado para o estudo das causas e conseqüências da obesidade humana⁽²⁵⁾. Diversos estudos experimentais têm demonstrado que a obesidade induzida por diferentes tipos de dietas com alto teor de gordura e/ou altamente energéticas acarretam disfunção miocárdica em roedores^(29,32-35). Du Toit et al.⁽³²⁾ mostraram que a obesidade deprime a função miocárdica em situação basal e após isquemia em ratos submetidos à dieta de cafeteria¹ por 16 semanas. Outros autores observaram prejuízo funcional em

¹ Dieta de cafeteria: dieta rica em gorduras por adição à ração padrão e a água de uma variedade de produtos palatáveis de supermercado como: biscoitos de chocolate, salame, queijo, banana, marshmallows, achocolatado e manteiga de amendoim. – Scalfani AA. and Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* 1976; 17: 461-71

cardiomiócitos isolados, com depressão no pico de encurtamento e atraso no tempo de relaxamento, em modelos de obesidade induzidos por dietas ricas em gordura^(29,33). Pesquisas recentes mostram que ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura, durante 15 semanas, apresentam disfunção miocárdica em condições basais e após manobras inotrópicas^(34,35).

Embora seja evidente que uma variedade de alterações e/ou danos no desempenho cardíaco, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, ocorra com a elevação da quantidade de tecido adiposo, os mecanismos responsáveis por estas alterações não estão estabelecidos. Diversos fatores têm sido apontados como possíveis responsáveis por anormalidades cardíacas em modelos de obesidade^(29,34), entre eles, o sistema beta (β)-adrenérgico, um importante mecanismo de regulação da contração e relaxamento do miocárdio^(36,37). O sistema β -adrenérgico é um dos principais mecanismos neuro-humorais de modulação da função cardíaca, atuando, tanto em condições fisiológicas quanto em situações patológicas^(36,38,39). A via β -adrenérgica é constituída por adrenoreceptores β , proteínas de ligação ativadora e inibitória (G_s e G_i), adenilato ciclase e adenosina monofosfato cíclico (AMPC)⁽⁴⁰⁾. O coração é composto por três subtipos de β -adrenoreceptores, β_1 , β_2 e β_3 . Os receptores β_1 e β_2 são expressos na proporção de 75 a 80%, 15 a 18%, respectivamente⁽⁴¹⁾, sendo que, ambos promovem efeitos inotrópicos, cronotrópicos e lusitrópicos positivos em resposta à um β -agonista^(41,42). Por outro lado, os receptores β_3 , representam 2 a 3% em condições normais esses receptores agem como mediadores do efeito inotrópico negativo⁽⁴³⁾, entretanto, são predominantemente inativos em condições fisiológicas normais^(41,44). Ambos os receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos são acoplados à proteína G estimulatória (G_s), que acarreta ativação da adenilato ciclase e, posteriormente, aumento dos níveis de AMPC. O acúmulo de AMPC acarreta maior ativação da proteína quinase A (PKA), que consequentemente, desencadeia alterações no

ciclo Ca^{+2} intracelular, uma vez que, a PKA fosforila diversas proteínas que são essenciais para função cardíaca, incluindo os canais de cálcio do tipo L^(45,46), fosfolambam⁽⁴⁷⁾, troponina I⁽⁴⁸⁾, e os receptores de rianodina^(49,50) (Figura 1). A fosforilação dos canais do tipo L e dos receptores de rianodina (RyR), estimulados pela PKA, acarretam aumento no influxo de Ca^{+2} citosólico^(37,51-53). O estímulo da PKA também provoca aumento da atividade da bomba de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) devido ao aumento da fosforilação do fosfolambam (PLB) na serina 16 (PLBSer16). A maior atividade da SERCA2a possibilita maior recaptura de Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático, resultando em aceleração do processo de relaxamento^(37,51,54).

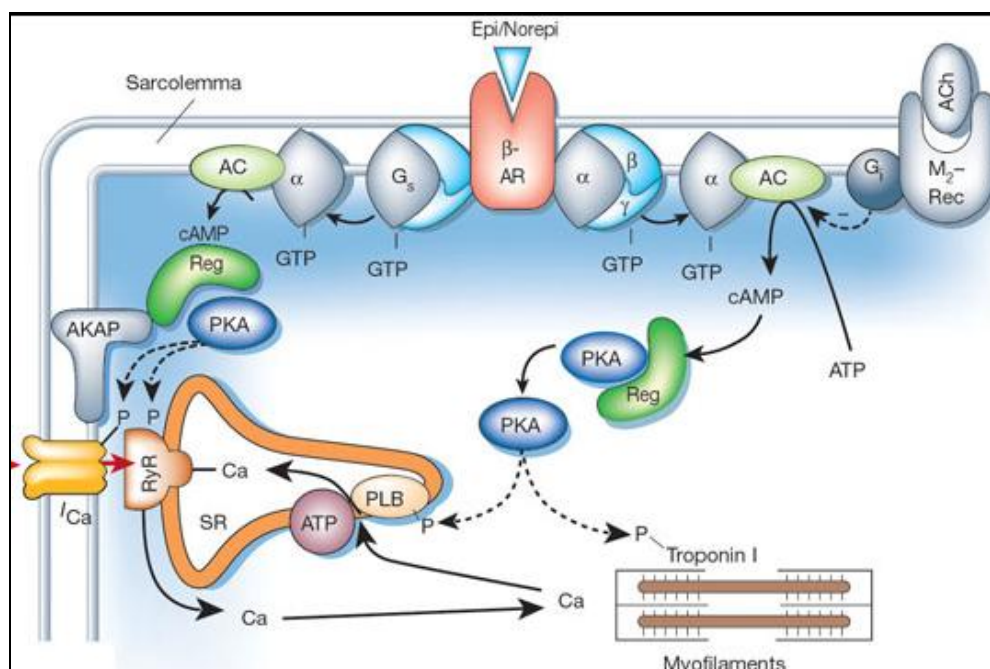


Figura 1. Ativação do receptor β -adrenérgico e fosforilação de alvos relevantes para o acoplamento excitação-contracção. AC, adenilato-ciclase; ACh, acetilcolina; AKAP, proteína de ancoragem quinase A; β -AR, receptor β -adrenérgico; M2-Rec, receptor muscarínico-M₂; PLB, GTP, Guanina trifosfato; Fosfolambam; Reg, subunidade regulatória da PKA; SR, retículo sarcoplasmático. (Modificado de Bers DM⁴⁹)

A regulação da função cardíaca pelo sistema β -adrenérgico é mediada também pela atividade da proteína G, que tem como finalidade promover a ligação do receptor β à adenilato ciclase para que ocorra a formação de AMPc. A atividade da adenilato ciclase é

modulada por duas proteínas G: G_s com capacidade de estimular e, G_i , capaz de inibir a ativação da adenilato ciclase⁽⁵⁵⁾. A proteína G_s é formada pelas subunidades α , β e γ na forma inativa; a subunidade $G_s\alpha$ encontra-se acoplada à guanina difosfato (GDP). Após ação de um agonista sobre o receptor β , a $G_s\alpha$ substitui o GDP por guanina trifosfato (GTP), separa-se das subunidades β e γ , e, interage com a adenilato ciclase que, ao ser ativada, produz AMPc^(40,56) (Figura 2).

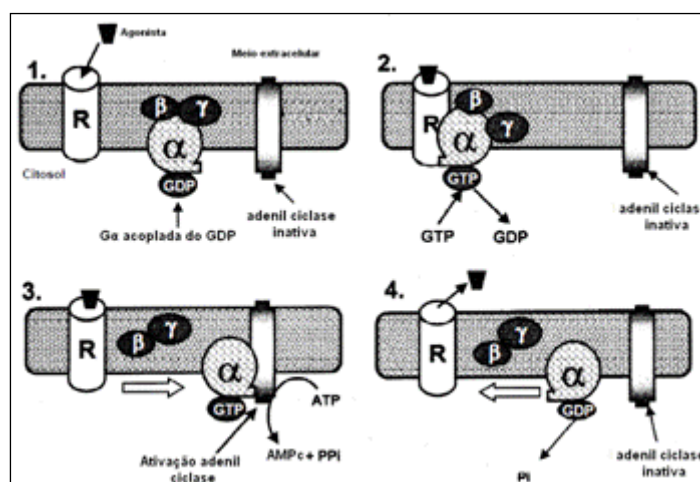


Figura 2. Representação esquemática do acoplamento entre R: receptores β -adrenérgicos e a proteína $G_s\alpha$; GTP, Guanina trifosfato; GDP, Guanina difosfato; Pi fósforo inorgânico; PPI difosfato inorgânico; AMPc, Adenosina monofosfato cíclico. (Modificado de Evora et al⁵⁷)

Embora seja bem estabelecido que os receptores β -adrenérgicos e a proteína G em cardiomiócitos desempenham funções importantes na regulação da performance cardíaca, pesquisas têm mostrado que, em situações patológicas, incluindo diabetes e insuficiência cardíaca, alterações na expressão e/ou atividade dos receptores β -adrenérgicos e da proteína G promovem anormalidades funcionais⁽⁵⁷⁻⁶³⁾. Na obesidade, em modelos experimentais, somente dois estudos realizados por Carroll et. al.^(64,65) abordam a relação entre a função cardíaca e a via β -adrenérgica. Esses autores mostram que a obesidade promove redução da resposta contrátil cardíaca à estimulação β -adrenérgica, no entanto, não houve alteração na densidade e afinidade dos receptores β em coelhas obesas alimentadas com dieta hiperlipídica durante 12 semanas.

Em razão da carência de informações e estudos que avaliaram a relação entre a obesidade e a via β -adrenérgica na performance cardíaca, a proposta deste estudo foi investigar a expressão protéica dos componentes do sistema β -adrenérgico no miocárdio de ratos obesos. A hipótese deste estudo é que o prejuízo funcional em ratos obesos seria decorrente da menor expressão dos receptores β -adrenérgicos, bem como, redução dos níveis de proteína $G_s\alpha$ miocárdica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, 150g de peso corporal, mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “U.S. National Institutes of Health”⁽⁶⁶⁾ e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação Científica (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo(UFES) sob o protocolo nº017/2011.

Esta pesquisa foi desenvolvida em fundamental parceria com o laboratório de Músculo Papilar Isolado e de Western Blot, coordenados pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna. Esses laboratórios são parte do Laboratório Experimental da Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, UNESP.

2.2- Protocolo Experimental

Os ratos foram randomizados em dois grupos: alimentados com dietas normolipídica (DN, n= 25) ou hiperlipídica (DH, n= 25). Os ratos DN receberam ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil) e os DH ciclos de quatro rações hiperlipídicas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil) de forma rotativa a cada 24 horas, por um período de 18 semanas. Os ratos DN e DH receberam 50 g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada. A oferta de água foi *ad libitum*.

2.2.1- Composição das Rações Padrão e Hiperlipídica

A ração padrão RC Focus 1765 é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico. As quatro rações hiperlipídicas, alternadas diariamente, RC Focus 2415, 2414, 2416 e 2413 apresentam a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes, chocolate, bacon, baunilha e queijo, respectivamente.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1- Composição dos macro e micronutrientes das rações (%)

Rações		
Componentes	Padrão	Hiperlipídica
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais	11,3	12,1
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

2.3- Avaliação Nutricional dos Animais

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal e índice de adiposidade. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada ração (g x kcal). Com a finalidade de analisar a capacidade do animal converter a energia consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso corporal dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100⁽⁶⁷⁾.

2.4- Caracterização dos Grupos

Os ratos DN e DH foram mantidos em suas respectivas dietas e o peso foi aferido semanalmente. A partir da semana em que se observou diferença estatística de peso corporal entre os grupos DN e DH os animais foram alocados em grupos Controle (C) e Obeso (Ob), caracterizando o momento *inicial da obesidade*. O procedimento acima foi adotado, baseando-se em trabalhos anteriores^(35,68). Após a caracterização do *período inicial de obesidade*, os animais permaneceram por mais 15 semanas de experimento.

A obesidade nos animais ao final do protocolo experimental foi determinada utilizando-se o índice de adiposidade. Diversos estudos têm utilizado este índice como ferramenta para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores^(28,69,70). Esse método

de baixo custo é facilmente realizado, e permite mensurar os depósitos de gordura corporal de maneira precisa e consistente.

Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos submetidos à ração padrão e hiperlipídica poderiam apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente⁽⁷¹⁾ mostrou que este fato pode conduzir a erro de classificação, ou seja, animais submetidos à ração padrão poderiam ser classificados como controle, quando na realidade, exibem características de animais obesos, ou vice versa. Por essa razão, torna-se necessário estabelecer um critério que separe os animais em dois grupos distintos de acordo com o índice de adiposidade. Com essa finalidade, foi construído intervalo de 95% de confiança (IC) para a média do índice de adiposidade dos ratos controle e obeso. Sendo adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do C e o limite inferior do Ob; a partir deste ponto serão excluídos do grupo C os animais com índice de adiposidade acima do PS e do grupo Ob os animais com índice de adiposidade abaixo do PS, garantido a homogeneidade dos grupos tratado e controle.

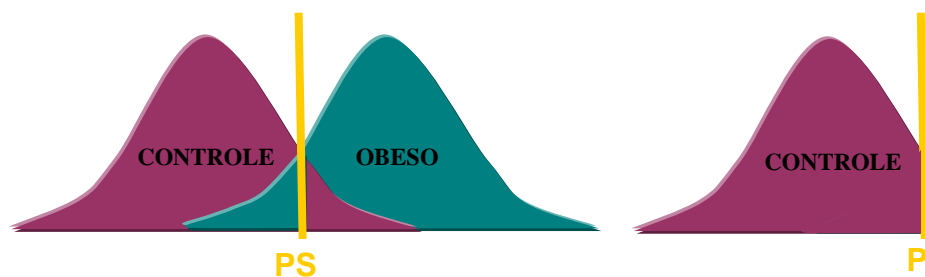


Figura 3. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso.

2.5- Obesidade e Comorbidades

As alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias,

hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^(28,29,70,72-75), possuem frequentemente associadas à obesidade, foram avaliadas nos grupos controle e obeso.

2.5.1- Hipertensão Arterial Sistêmica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida indiretamente por pletismografia de cauda, utilizando-se eletro esfigmomanometro Narco Bio-System[®], modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge[®] MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA).

2.5.2- Intolerância à Glicose

As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após período de jejum de 6 horas e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich,[®] St Louis, MO, USA), equivalente a 2g/Kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos zero, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil, Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A intolerância à glicose foi avaliada pelo cálculo da área glicêmica.

2.5.3- Resistência Sistêmica à Insulina

O índice *Homeostatic Model Assessment - Insulin Resistance* (HOMA-IR) baseou-se nas concentrações séricas de glicose e insulina de jejum. Este índice é frequentemente utilizado na literatura para avaliar resistência à ação da insulina^(28,77). O cálculo do HOMA-IR foi realizado pela seguinte fórmula: concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$) multiplicada pelos níveis glicêmicos (mM/L) dividida por 22,5⁽⁷⁸⁾.

2.5.4- Dislipidemias e Hiperglicemia

Para análise do perfil glicêmico e lipídico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), eutanasiados por decapitação e submetidos à toracotomia mediana. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf[®] Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade foram determinadas utilizando-se *kits* específicos (BIOCLIN[®], Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

2.5.5- Hiperinsulinemia e Hiperleptinemia

As concentrações de leptina e insulina foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se *kits* específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA). A leitura

foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.6- Remodelação Cardíaca

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca^(28-31,34,69), o coração foi analisado por meio de estudos estruturais e moleculares. A estrutura cardíaca foi avaliada *post mortem* por meio de análise macroscópica, e a análise molecular foi realizada utilizando a técnica de Western Blot.

2.6.1- Perfil Morfológico Cardíaco

A análise estrutural macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de remodelação cardíaca atrial e ventricular^(79,80). A presença ou ausência de hipertrofia, foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, do átrio, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o comprimento da tíbia.

2.6.2- Análise do Sistema β -adrenérgico

O sistema β -adrenérgico foi avaliado por meio de análises moleculares, conforme técnicas descritas abaixo.

2.6.2.1- Western Blot

A expressão protéica dos receptores β -adrenérgicos (β_1 e β_2) e da proteína $G_s\alpha$ foi realizada pela técnica de *Western Blot*. Todas as expressões normalizadas pela quantificação da proteína de controle interno β -actina. Este método é frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico⁽⁸⁷⁾,

sendo constituído das seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos *blots* de polipetídeos⁽⁸⁸⁾.

2.6.2.2- Extração das Proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de protease (0,1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para tubos *ependorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford⁽⁸⁹⁾, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.6.2.3- Eletroforese em Gel

Após a quantificação da concentração protéica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed). O gel de resolução foi confeccionado nas

concentrações de 8 a 12%, de acordo com o peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por um período variável de acordo com o tamanho da proteína, em média 1h30 minutos, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.6.2.4- Transferência e Identificação das Proteínas

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) contendo tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução bloqueadora a 0,5% de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil, Araçatuba, SP, Brasil), dissolvido em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente (24°C) sob constante agitação. Em seguida, a membrana foram lavada três vezes em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de

nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

2.6.2.4.1- Anticorpos Primários Utilizados

- Receptor β_1 : β_1 -adrenergic receptors (AR), *rabbit IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.
- Receptor β_2 : β_2 -adrenergic receptors (AR), *rabbit IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.
- Proteína $G_s\alpha$: Anti- $G_s\alpha$, *rabbit IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:500.

2.6.2.4.2- Anticorpo de Normalização

- Proteína β -Actina: β -Actin, *mouse IgG1* (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:200.

2.6.2.4.3- Anticorpo Secundário

Os anticorpos secundários, anti-rabbit IgG-HRP SC2004 e anti-mouse IgG-HRP SC2005 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA), foram utilizado na concentração de 1:10000.

2.6.2.5- Quantificação das Proteínas

As análises quantitativas das bandas protéicas (*blots*) foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

2.7- Análise Estatística

As características gerais, as comorbidades, as análises macro e moleculares dos grupos experimentais foram expressas por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. Foram utilizados teste “*t*” de *Student* e *Mann Whitney* para amostras independentes de acordo com a distribuição dos dados. A evolução semanal do peso corporal foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ⁽⁹⁰⁾.

3 RESULTADOS

3.1- Composição dos Grupos

Este trabalho faz parte do projeto “Participação da Via β -Adrenérgica na Disfunção Miocárdica Induzida pela Obesidade”, com financiamento científico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), que avaliou, além da expressão protéica, os componentes da via β -adrenérgica por meio de análise da função cardíaca em músculo papilar isolado.

A partir dos critérios de exclusão, mencionados no “Material e Métodos” (pags. 19 e 20), permaneceram no estudo vinte animais do grupo controle (C; n=20) e dezessete animais do grupo obeso (Ob; n=17). Em virtude de limitação da técnica de eletroforese e tentativa de melhor acurácia destes resultados a expressão protéica e as demais análises, foram realizadas em sete animais de cada grupo, selecionados por sorteio, (C; n=7 e Ob; n=7).

3.2- Evolução do Peso Corporal

A Figura 4 ilustra a evolução do peso semanal dos grupos C e Ob. O peso corporal foi semelhante nas duas primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos; entretanto, após a 3ª semana, o peso corporal dos animais Ob foi significativamente maior que os animais C (Figura 4). Neste momento, o maior peso corporal dos animais Ob foi associado ao aumento do índice de adiposidade, caracterizando o *momento inicial de obesidade*, de acordo com trabalhos prévios^(92-97,102).

A evolução do peso corporal dos grupos, após determinação do *momento inicial da obesidade* permaneceu durante o período experimental. O peso corporal dos animais Ob manteve-se significativamente maior que os animais C durante as 15 semanas de experimento.

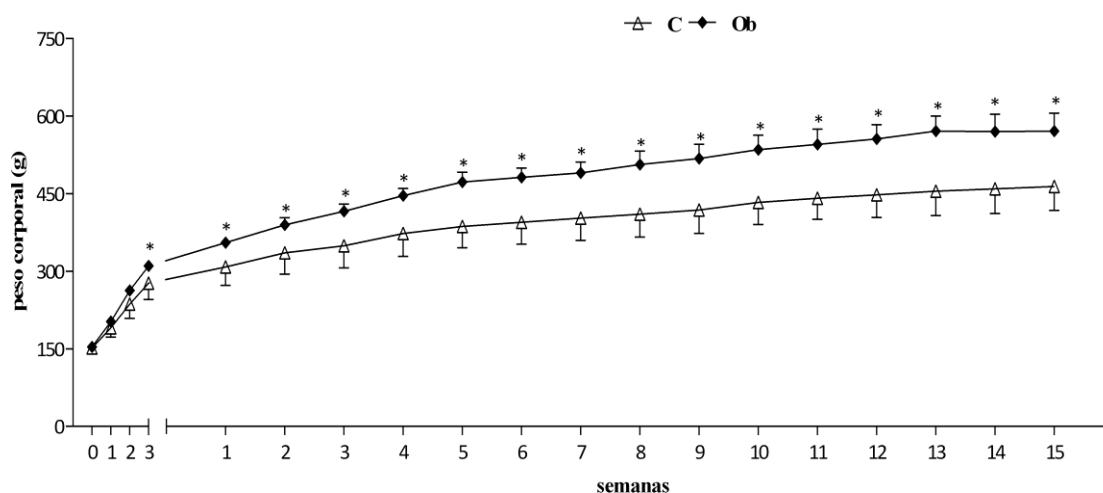


Figura 4. Evolução semanal do peso corporal dos animais Controle (C, n=7) e Obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$.

3.3- Perfil Nutricional

A Tabela 1 ilustra as características nutricionais dos animais utilizados no experimento. Os animais Ob apresentaram maiores valores de peso corporal no momento inicial de obesidade, peso corporal final, ganho de peso, depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, gordura corporal total e índice de adiposidade em relação ao grupo C.

Embora os animais Ob tenham consumido menor quantidade de ração que o grupo C, a ingestão calórica foi similar entre os grupos, no entanto, a eficiência alimentar foi maior nos animais Ob durante o período experimental.

Tabela 1. Perfil nutricional

Variáveis	Grupos	
	C (n=07)	Ob (n=07)
PCI (g)	309 ± 35	356 ± 8*
PCF (g)	464 ± 46	571 ± 34*
Ganho de peso (g)	155 ± 26	215 ± 30*
Epididimal (g)	4,3 ± 2,3	16,3 ± 3,7*
Retroperitoneal (g)	7,2 ± 2,2	23,0 ± 6,3*
Visceral (g)	4,5 ± 1,3	12,7 ± 3,8*
Gordura corporal total (g)	16,0 ± 4,6	52 ± 12,4*
Índice de adiposidade (%)	3,4 ± 0,6	9,2 ± 2,5*
Ingestão alimentar (g/dia)	25,1 ± 2,2	20,2 ± 1,3*
Ingestão calórica (Kcal/dia)	74,3 ± 6,5	73,7 ± 5,0
Eficiência alimentar (%)	2,00 ± 0,28	2,77 ± 0,24*

Dados expressos em média ± desvio-padrão. PCI: peso corporal momento inicial da obesidade; PCF: peso corporal final. C: controle; Ob: obeso. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05.

3.4- Perfil Bioquímico

A Tabela 2 mostra as análises bioquímicas dos animais C e Ob. Os níveis séricos de triglicerídeos foram maiores nos animais Ob em relação ao C. Não houve diferença significativa nas demais dosagens séricas entre os grupos.

Tabela 2. Análise bioquímica

Variáveis	Grupos	
	C (n=07)	Ob (n=07)
Colesterol (mg/dL)	62,4 ± 11,5	67,5 ± 18,0
HDL (mg/dL)	23,5 ± 2,8	26,6 ± 5,8
LDL (mg/dL)	31,3 ± 5,7	36,5 ± 9,4
Triglicerídeos (mg/dL)	44,4 ± 15,6	69,9 ± 61,5 [#] *
Glicose (mg/dL)	125 ± 10	138 ± 14

Dados expressos em média ± desvio-padrão C: controle; Ob: obeso; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. Teste “t” de Student para amostras independentes. [#]Dados expressos em mediana ± semi-amplitude. Teste Mann Whitney para amostras independentes. * p<0,05.

3.5- Pressão Arterial Sistólica

Não houve diferença significativa entre os grupos para medida da pressão arterial sistólica final, C (127 ± 4) e Ob (127 ± 14).

3.6- Perfil Glicêmico

A Figura 5 ilustra o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C e Ob. Após 15 semanas de experimento, a área glicêmica foi maior no grupo Ob em relação ao C.

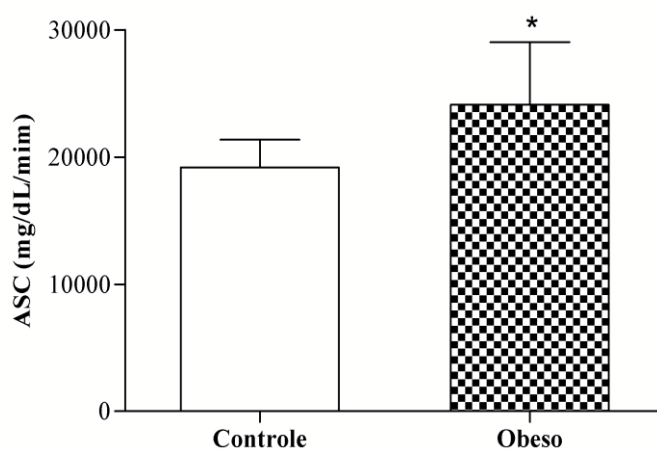


Figura 5. ASC, Área sob a curva obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$.

3.7- Níveis Séricos de Insulina

A Figura 67 mostra a dosagem de insulina dos ratos C e Ob. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,06$).

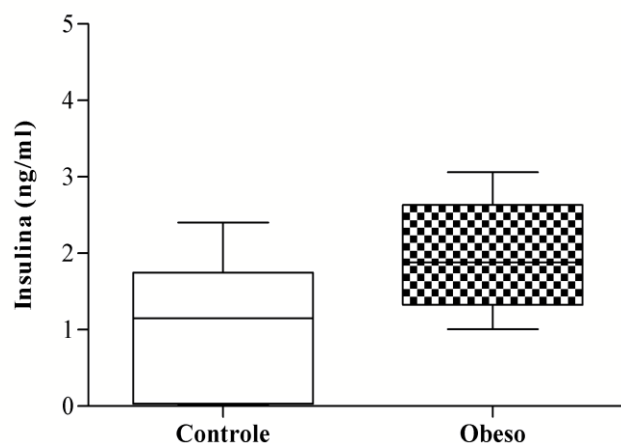


Figura 6. Níveis séricos de insulina dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em mediana \pm intervalo interquartil 25% e 75%. Teste Mann Whitney para amostras independentes.

3.8- Índice de Resistência à Insulina

A Figura 7 apresenta o resultado do índice HOMA-IR dos grupos C e Ob. Os animais Ob apresentaram maiores valores que os animais C.

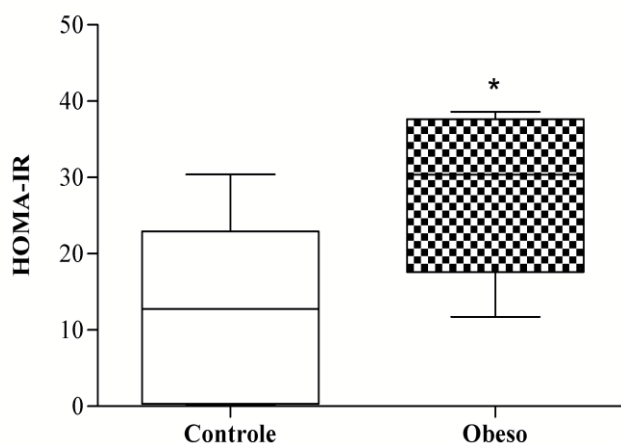


Figura 7. Índice HOMA-IR dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em mediana \pm intervalo interquartil 25% e 75%. Teste Mann Whitney para amostras independentes. * $p<0,05$.

3.9- Níveis Séricos de Leptina

A Figura 8 apresenta a dosagem de leptina dos ratos C e Ob. Os animais Ob apresentaram níveis séricos de leptina maiores que os C.

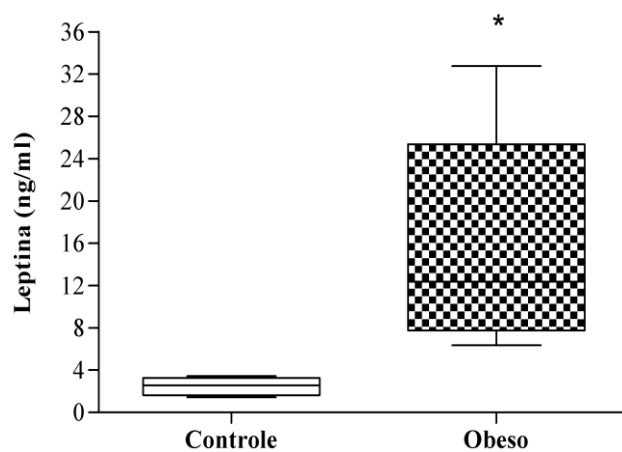


Figura 8. Níveis séricos de leptina dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em mediana \pm intervalo interquartis 25% e 75%. Teste Mann Whitney para amostras independentes * $p < 0,05$.

3.10- Perfil Morfológico Cardíaco

A Tabela 3 ilustra o perfil morfológico cardíaco *post mortem* dos ratos C e Ob. Os animais Ob apresentam aumento nos pesos do coração, ventrículos esquerdo e direito, átrio e nas relações coração/tíbia, VE/tíbia, VD/tíbia e AT/tíbia em relação aos animais C. Não houve diferença significativa no comprimento da tíbia entre os dois grupos.

Tabela 3. Perfil morfológico cardíaco *post mortem*

Variáveis	Grupos	
	C (n=07)	Ob (n=07)
Coração (g)	1,11 ± 0,07	1,30 ± 0,08*
VE (g)	0,82 ± 0,05	0,92 ± 0,05*
VD (g)	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,04*
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01*
Tíbia (cm)	4,34 ± 0,10	4,39 ± 0,09
Coração/Tíbia (g/cm)	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,02*
VE/ Tíbia (g/cm)	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01*
VD/ Tíbia (g/cm)	0,05 ± 0,001	0,06 ± 0,009*
AT/ Tíbia (g/cm)	0,021 ± 0,002	0,025 ± 0,003*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05.

3.10.1- Determinação do Teor de Água nos Tecidos Cardíaco Pulmonar e Hepático

A Tabela 4 mostra o percentual de umidade dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C e Ob. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 4. Teor de água dos tecidos.

Variáveis	Grupos	
	C (n=07)	Ob (n=07)
VE (%)	76,4 ± 4,4	74,4 ± 0,3
VD (%)	74,6 ± 1,2	74,8 ± 0,4
AT (%)	76,9 ± 1,4	77,1 ± 0,9
Pulmão (%)	77,3 ± 2,8	78,8 ± 2,9
Fígado (%)	66,5 ± 5,2	67,0 ± 5,7

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05.

3.11- Expressão das Proteínas do Sistema β -adrenérgico Miocárdico

As Figuras 9, 10 e 11 demonstram os valores obtidos na expressão protéica dos receptores β -adrenérgicos e da proteína $G_s\alpha$, normalizados pela expressão da proteína de controle interno (β -actina). Não houve diferença significativa entre os grupos C e Ob para a expressão protéica dos receptores β -1, β -2 e proteína $G_s\alpha$.

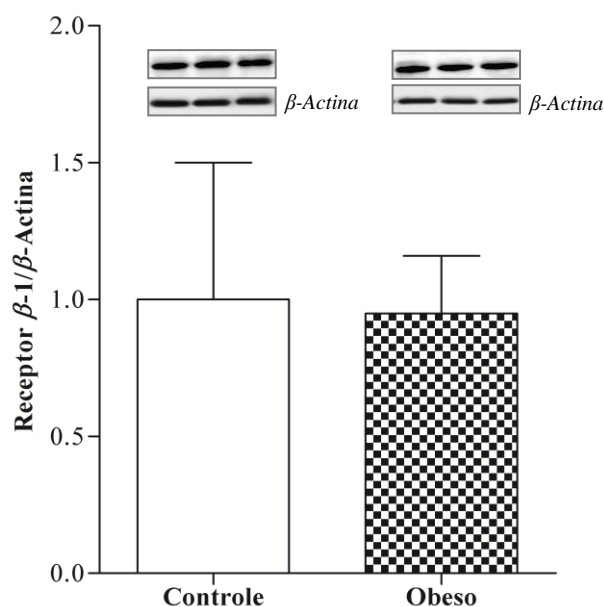


Figura 9. Expressão protéica do receptor β -1 no miocárdio dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes.

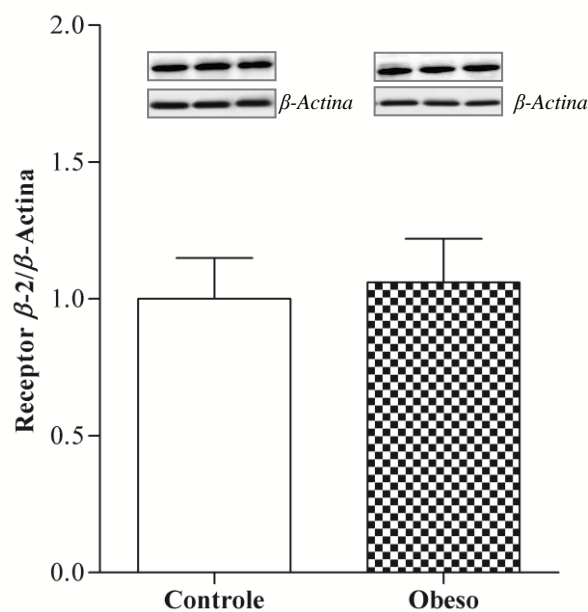


Figura 10. Expressão proteica do receptor β -2 no miocárdio dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes.

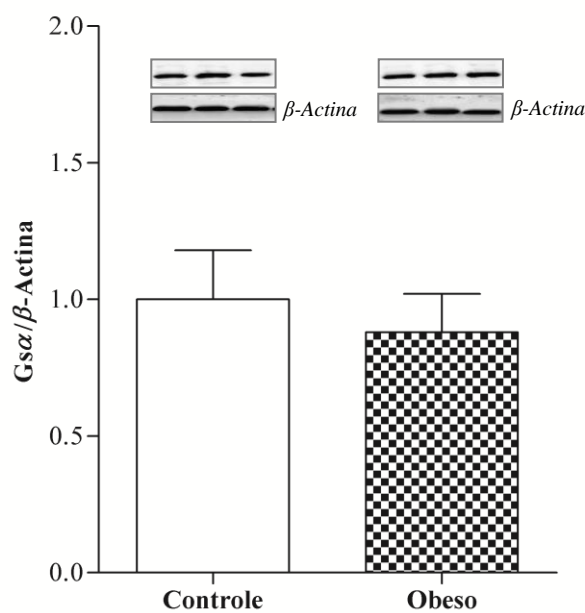


Figura 11. Expressão proteica Gsa no miocárdio dos animais controle (C, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes.

4 DISCUSSÃO

4.1-Constituição dos Grupos Controle e Obeso

Neste experimento o tratamento foi eficaz na promoção da obesidade, entretanto, na experimentação biológica, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada homogeneidade de resposta, animais submetidos a dietas diferentes podem apresentar características semelhantes. Assim, a heterogeneidade de resposta, dentro do mesmo grupo, pode induzir resultados e interpretações errôneas. Desta forma, de acordo com a literatura⁽⁹²⁻⁹⁷⁾ foi utilizado critério de classificação a partir do índice de adiposidade, possibilitando a constituição de grupos com características mais homogêneas, destacando a identificação dos animais verdadeiramente controles e obesos, conforme descrito na seção “Material e Métodos”. O descarte dos animais pela ausência de adesão ao critério estabelecido foi de 20% e 32% nos grupos controle e obeso, respectivamente. Estes resultados estão próximos aos encontrados na literatura que utilizaram o mesmo critério de classificação⁽⁹²⁻⁹⁵⁾.

4.2-Momento Inicial da Obesidade

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com dieta hiperlipídica promoveu obesidade a partir da 3ª semana, corroborando com os achados de outros pesquisadores^(92,96), contudo, poucos investigadores que trabalham com modelo experimental de obesidade, induzido por dieta, verificam o momento inicial de obesidade. Este fato pode ocasionar erro de interpretação dos dados, principalmente em experimentos de curta duração, por não discriminar o tempo de exposição à obesidade.

Cabe salientar que a diferença significativa no peso corporal entre os grupos observada a partir da 3ª semana persistiu até o final do experimento, constituindo assim 15 semanas de obesidade.

4.3-Perfil Nutricional

No período experimental, o tratamento com dieta hiperlipídica foi eficaz na promoção da obesidade caracterizada pelo aumento do índice de adiposidade, parâmetro utilizado para diferenciação dos grupos, o qual utiliza o somatório dos depósitos de gordura corporal. Os animais obesos apresentaram índice de adiposidade 170% maior que os animais controle. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que utilizam este parâmetro na classificação da obesidade em roedores^(31,68,69,96-101,102).

A dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos insaturados utilizada neste experimento, promoveu nos ratos obesos elevação do peso e da gordura corporal total. O peso nos animais obesos aumentou 23% em relação aos animais controle, estes dados corroboram com outros achados, que visualizaram elevação do peso corporal em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, por 15 semanas^(68,102,103).

Nos achados do presente estudo a gordura corporal total (g) foi 225% maior no grupo obeso em relação ao grupo controle. Estes dados comparados com o peso corporal final, que modificou apenas 23% entre os grupos, indica que esta variável subestima o grau de obesidade, assim o peso corporal, de acordo com alguns autores^(68,94-97,102), pode não ser um bom indicador de obesidade. Lin et. al.⁽¹⁰⁴⁾ avaliando camundongos tratados com dieta hiperlipídica por 8, 15 e 19 semanas, demonstraram expressivo aumento dos depósitos de gordura quando comparados com o peso corporal, representando aumento de 30,5% no peso corporal final *versus* 130% e 144% nos depósitos de gordura epididimal e perirenal, respectivamente⁽¹⁰⁴⁾.

Estudos mostram que o consumo de dieta rica em gordura é responsável pelo aumento da adiposidade, os autores relatam que uma dieta contendo $\geq 30\%$ da energia proveniente de gordura favorece a indução da obesidade, demonstrando relação positiva

entre os níveis de gordura na dieta e o aumento nos depósitos de tecido adiposo^(96,102,105). A dieta hiperlipídica, utilizada neste estudo, apresentou teor energético de 3,65 Kcal/g *versus* 2,95 Kcal/g da dieta padrão, gerando elevação de 24% no conteúdo calórico por grama. Além disso, a dieta hiperlipídica apresenta 49,2% da Kcal proveniente de gordura (Quadro 1).

Pesquisadores identificam que uma dieta rica em gordura favorece o desenvolvimento da obesidade, mesmo quando seu consumo é similar ao da dieta em gramas^(96,102,103,106,107). O presente estudo mostrou menor ingestão alimentar dos animais obesos comparados ao grupo controle, resultando em ingestão calórica semelhante entre os grupos. Estes dados estão de acordo com White et. al.⁽¹⁰²⁾ que mostram no grupo tratado com dieta hiperlipídica consumo significativamente menor em gramas que o grupo dieta padrão, no entanto, quantidade calórica similar entre os grupos.

Apesar do menor consumo alimentar e ingestão calórica semelhante entre os grupos, a eficiência alimentar foi significativamente maior nos animais obesos em relação aos animais controle. A eficiência alimentar tem sido utilizada para verificar a conversão da ingestão alimentar em ganho de peso corporal^(29,105). Desta maneira, mesmo sem aumento na quantidade de alimento ingerido, é possível o desenvolvimento de obesidade, pois mudanças na composição dos nutrientes da dieta, como aumento na quantidade de lipídeos, podem alterar a eficiência na utilização do alimento e sua conversão em tecido adiposo^(105,108,109). Os resultados mostram que a eficiência alimentar foi 38,5% maior nos animais Ob. Os dados do presente estudo estão em concordância com diversas pesquisas que verificaram maior eficiência alimentar, ganho de peso e tecido adiposo em animais tratados com dieta hiperlipídica por 10 e 15 semanas^(94-97,102,103). Estes achados possuem relação com quantidade de gordura utilizada e com a densidade energética por grama da ração hiperlipídica e não em função de uma provável hiperfagia^(102,105). Jequier⁽¹¹⁰⁾ relata

maior potencial de eficiência alimentar decorrente do conteúdo de gordura na dieta para indução de ganho de peso, quando comparados a outras dietas com maior aporte de carboidratos ou proteínas.

4.4-Comorbidades

Os resultados do presente estudo evidenciam algumas comorbidades relacionadas com a obesidade experimental, como hipertrigliceridemia, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, resistência à insulina e hiperleptinemia^(38,39,70,72,76).

A obesidade acarreta dislipidemia caracterizada por níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos (TG), colesterol e diminuição dos níveis séricos de HDL^(111,112). Neste trabalho a obesidade acarretou elevação nos níveis de triglicerídeos (TG), corroborando com outras pesquisas realizadas em 8, 12 e 16 semanas, que mostram hipertrigliceridemia nos animais obesos⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. No entanto, difere de estudos que não identificaram diferença nos níveis de TG durante 12 e 30 semanas de obesidade^(29, 31,95,116). Pesquisas apontam que a concentração dos níveis de TG tem estreita relação com a dieta, assim, a hipertrigliceridemia visualizada no presente estudo pode ocorrer em consequência da diminuição da absorção de TG pelos tecidos periféricos⁽¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾.

A pressão arterial sistólica final (PASF), no presente estudo não se alterou com a obesidade. Os resultados estão em concordância com alguns autores^(92,93,95,96,119) e diverge de outros que mostram elevação dos níveis da PASF^(32,94). Nascimento et. al.⁽⁹⁷⁾, que avaliaram a via endotelial em animais obesos, alimentados com dieta hiperlipídica por 30 semanas, mostram melhora no relaxamento endotelial, concomitante ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), importante vasodilatador. A elevação da síntese de NO pode ser consequente da hiperinsulinemia e hiperleptinemia visualizada em animais

obesos⁽⁹⁷⁾, esse fator pode ter sido determinante para a ausência de hipertensão arterial no grupo Ob.

O teste de tolerância à glicose mostrou que, após sobrecarga glicêmica, os animais obesos apresentam área glicêmica maior em relação ao grupo controle, demonstrando que a obesidade promoveu intolerância à glicose, embora os valores da glicemia de jejum não tenham demonstrado diferença entre os grupos. Esses resultados estão em consonância com trabalhos que mostram intolerância à glicose decorrente da obesidade^(102,113). Os achados do presente estudo mostram que a obesidade promoveu aumento nos níveis séricos de insulina, embora não significativo entre os grupos ($p=0,06$), além disso, houve resistência à insulina no grupo Ob, conforme visualizado pelo maior HOMA-IR, índice frequentemente utilizado como indicador de resistência insulínica⁽¹²⁰⁾. Assim, os resultados do presente estudo mostram que a euglicemia foi mantida às custas da elevação de 82% nos níveis de insulina sérica. Pesquisas mostram que a obesidade induz estado de resistência insulínica frente à insuficiência dos níveis normais deste hormônio na regulação do metabolismo da glicose^(121,122), este cenário induz as células β -pancreáticas secretarem maiores quantidades de insulina, visando maior captação de glicose, na tentativa de evitar a hiperglicemia⁽¹²³⁾. Ao longo do tempo as células β , podem sofrer exaustão, acarretando quedas nos níveis de insulina, com consequente hiperglicemia. A condição de resistência à ação da insulina pode estar associada às anormalidades no transportador da glicose 4 (GLUT4) e/ou na via de sinalização insulínica, responsável pela translocação do GLUT4^(124,125). Estudos descrevem que a obesidade induzida por dieta tem sido correlatada com distúrbios no transporte de glicose, originada pela redução na expressão do GLUT4, caracterizando cenário de resistência insulínica⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾.

A presente pesquisa mostra que os níveis séricos de leptina foram maiores no grupo Ob em relação ao C. Desde que, este hormônio é secretado pelo tecido adiposo, alguns

autores têm relatado que os níveis de leptina se correlacionam com a quantidade de gordura corporal⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾. Nesta perspectiva, enquanto houve aumento de 225% na quantidade de gordura corporal, a leptina aumentou 537% nos animais Ob em relação aos animais C. Este resultado corrobora com outros autores que mostram que a redução de 10% no peso corporal resulta em 53% de diminuição nos níveis séricos de leptina, em contrapartida, o aumento dos mesmos 10% de peso corporal acarreta elevação de 300% na concentração sérica de leptina^(130,131). Pesquisas mostram que a leptina age no hipotálamo no controle da saciedade^(128,129). No entanto, estudos relatam que indivíduos obesos podem apresentar resistência à ação da leptina^(127,132-134). Nos achados do presente estudo fica evidenciado que o papel da leptina no controle da saciedade, às custas da hiperleptinemia, foi efetivo, uma vez que, os animais obesos ingeriram menor quantidade de alimento que o grupo controle.

4.5- Remodelação Cardíaca

Os resultados desta pesquisa corroboram com outros autores^(92,93) que mostram maiores pesos isolados das câmaras cardíacas nos animais Ob em relação aos animais C. O presente estudo indica aumento de 12%, 35%, 22% e 12% nos pesos do coração total, VD, AT e VE, respectivamente. A remodelação cardíaca pode também ser avaliada normalizando o peso do coração e de seus componentes pelo comprimento da tíbia, uma vez que, a curva de crescimento da tíbia é independente da presença lesões patológicas e/ou alterações no peso corporal do rato⁽¹³⁵⁾. Além disso, o aumento no peso das câmaras cardíacas, visualizado no presente estudo, sinalizam que houve hipertrofia cardíaca em decorrência do aumento de massa, desde que, não houve aumento do percentual de água nos tecidos cardíacos.

A literatura relata que remodelação cardíaca em indivíduos obesos pode ser decorrente de altas concentrações de insulina, leptina, angiotensina II, endotelina e catecolaminas⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾. Algumas pesquisas demonstram que a insulina desencadeia processo de hipertrofia cardíaca, estimulando a síntese e inibindo a degradação protéica no coração⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾, conforme ilustrado na Figura 13. O processo de hipertrofia cardíaca visualizado nos animais Ob, após 15 semanas de experimento, pode estar relacionado ao aumento de 82% nos valores séricos de insulina ($C=1,09\pm79$ vs $Ob=1,99\pm37$), apesar de não demonstrar diferença estatística ($p=0,06$). A literatura relata que a insulina está relacionada com ativação da via AKT- mTOR, ligando-se ao seu receptor de superfície (IR). Quando ativada, a via AKT- mTOR aumenta a síntese protéica, acarretando a hipertrofia cardíaca^(138,142-144). Além da insulina, a literatura também destaca que a leptina induz hipertrofia em cardiomiócitos de roedores⁽¹⁴⁵⁾. Desta forma, considerando o quadro hiperleptinêmico apresentado pelos animais do presente estudo, a leptina destaca-se como possível preditor da hipertrofia cardíaca encontrada neste animais. Alguns autores mostram que a leptina ao se ligar ao seu receptor (RL) presente em vários tecidos, inclusive no coração, promove ativação das proteínas RhoA/ROCK e translocação da p38 MAPK para o núcleo, acarretando hipertrofia em cardiomiócitos^(146,147) (Figura 14).

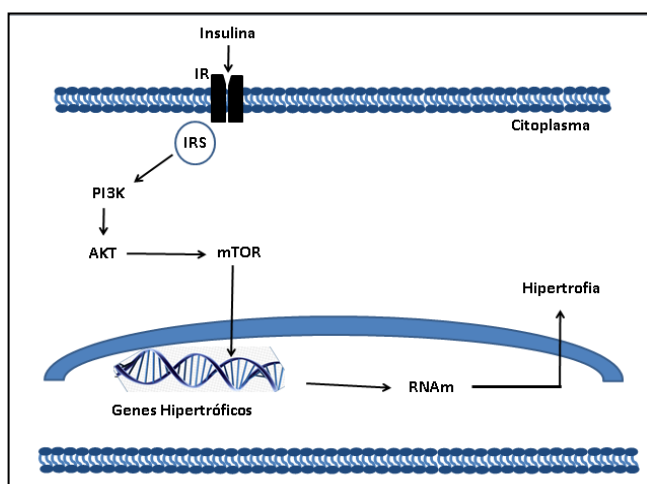


Figura 12. Via de sinalização hipertrófica da insulina em cardiomiócitos. Adaptado de Garcia JAD 2008.

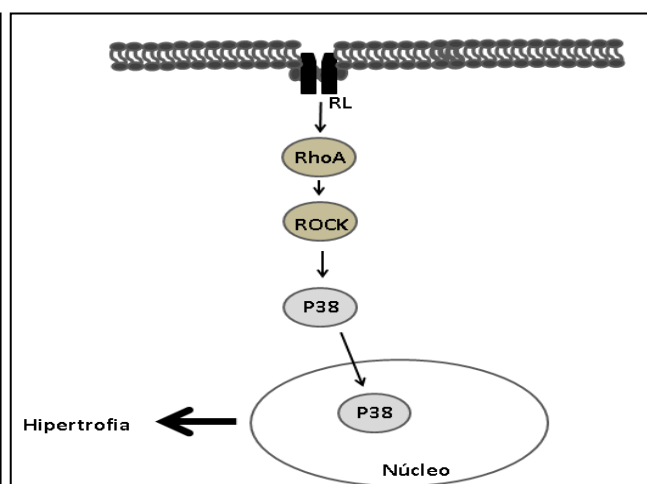


Figura 13. Via de sinalização hipertrófica em da leptina cardiomiócitos. Adaptado de Zeidan 2011.

4.5.1- Expressão Protéica do Sistema β -adrenérgico Miocárdico

Diante da importante função desempenhada pelo sistema β -adrenérgico na regulação da performance cardíaca, seus componentes têm sido investigados, em situações patológicas, incluindo do diabetes e insuficiência cardíaca, uma vez que alterações na expressão e/ou atividade dos receptores β -adrenérgicos e da proteína G promovem anormalidades funcionais⁽⁵⁷⁻⁶³⁾.

Na obesidade estudos sugerem que o prejuízo funcional cardíaco pode ser decorrente da menor ativação no sistema β -adrenérgico^(35,64,65,148). Cabrol et.al.⁽¹⁴⁸⁾ utilizando modelo canino de obesidade, relacionam a disfunção sistólica com menor afinidade dos receptores adrenérgicos. Leopoldo et.al.⁽³⁵⁾ avaliando ratos obesos, por dieta hiperlipídica insaturada, sugerem que a disfunção miocárdica decorrente do prejuízo na atividade dos canais de cálcio do tipo L está relacionada com alterações no sistema β -adrenérgico.

A transcrição de sinal ou sinalização responsável por desencadear as ações do sistema β -adrenérgico no miocárdio ocorrem desde que as catecolaminas ou um agonista adrenérgico liga-se a seu receptor, atuando como primeiro mensageiro na via β -adrenérgica. Este estímulo extracelular intermediado pela ação da proteína de ligação $G_s\alpha$ e sua ação sobre a adenilato ciclase, regulam a concentração de AMPc intracelular, segundo mensageiro, nesta cascata de sinalização. O aumento deste segundo mensageiro acarreta ativação da PKA, responsável por fosforilar proteínas fundamentais na cinética do Ca^{+2} intracelular. Essa cascata de eventos acarreta modificações na função de proteínas incluindo os canais de cálcio do tipo L^(45,46), fosfolambam⁽⁴⁷⁾, troponina I⁽⁴⁸⁾, e os receptores de rianodina, alterando atividade cardíaca^(49,50). Desta forma, na célula cardíaca os receptores β -adrenérgicos e a proteína $G_s\alpha$ participam ativamente de diversas funções

intracelulares, modulando a função cardíaca pela regulação dos processos de contração e relaxamento miocárdico^(36,37).

O período de obesidade induzido por dieta hiperlipídica neste experimento, não alterou de maneira significativa a expressão proteica dos componentes da via β -adrenérgica investigados. Os receptores adrenérgicos β -1, β -2 e a proteína $G_s\alpha$ foram semelhantes entre os grupos Ob e C, após 15 semanas de exposição à obesidade. Na obesidade, induzida por dietas com alta densidade energética^(64,65,149), poucos estudos avaliaram os componentes do sistema β -adrenérgico. Estudos de Carroll et. al.^(64,65), avaliando coelhas obesas por 12 semanas, mostram redução da resposta contrátil cardíaca à estimulação β -adrenérgica, no entanto, sem alteração na densidade e afinidade dos receptores^(64,65). Pesquisa realizada em modelo suíno de obesidade, alimentado por 50 semanas com dieta hiperlipídica, não identificou diferença nos níveis de RNAm dos receptores β -1 e β -2 analisados por PCR em tempo real. Em contraste, a expressão protéica obtida pela técnica de western blot, demonstrou diminuição do número de receptores β -1 e β -2 no ventrículo esquerdo⁽¹⁴⁹⁾. O autor salienta que a menor expressão dos receptores adrenérgicos pode estar relacionada com altas concentrações séricas de catecolaminas⁽¹⁴⁹⁾. O aumento da atividade do sistema simpático poderia causar prejuízo dos receptores β -adrenérgicos e modificar suas estruturas secundárias e terciárias⁽¹⁴⁹⁾. Dincer⁽¹⁴⁹⁾ destaca ainda, que o estado hipercatecolaminérgico, frequentemente visualizado em indivíduos com alto risco cardiometabólico, desencadeia modificações protéicas reversíveis e irreversíveis nas superfícies dos receptores. No entanto, os níveis de catecolaminas em sujeitos obesos são controversos na literatura. Pesquisa realizada por Zouhal et. al.⁽¹⁵⁰⁾ não encontrou diferença significativa nos níveis de catecolaminas circulantes em adolescentes obesas e com sobrepeso⁽¹⁵⁰⁾. Entretanto, resultados encontrados por Jabbour et. al.⁽¹⁵¹⁾ mostram diminuição nos níveis séricos de catecolaminas em adolescentes com sobrepeso e obesidade⁽¹⁵¹⁾. Contudo, pesquisa em

modelo de obesidade por dieta hiperlipídica, aponta elevação nos níveis plasmáticos de catecolaminas em animais alimentados com dieta rica em banha de porco, indicando correlação entre o tipo dieta e a concentração de catecolaminas circulantes⁽¹⁵²⁾.

Outro possível fator aventado pela literatura refere-se ao papel da leptina sobre a modulação do sistema β -adrenérgico. Estudo em modelo de obesidade genética (*ob/ob*) mostra prejuízo funcional de resposta β -adrenérgica, com concomitante diminuição na expressão da proteína $G_s\alpha$, no entanto, os autores não encontraram alterações na expressão proteica dos receptores β -1 e β -2⁽¹⁵³⁾. Cabe ressaltar que os animais geneticamente modificados (*ob/ob*) apresentam deficiência de leptina. Desde que a literatura relata que obesidade humana está associada à hiperleptinemia, os autores destacam que os desarranjos na sinalização do sistema β -adrenérgico, foram mediados pela deficiência de leptina. Assim, os animais *ob/ob* que receberam administração de leptina exógena restauraram a quantidade de proteína $G_s\alpha$ expressa no miocárdio⁽¹⁵³⁾. A ausência de alterações na expressão dos componentes do sistema β -adrenérgico visualizada no presente estudo pode ser decorrente do estado hiperleptinêmico visualizado nos animais obesos.

Embora os componentes do sistema β -adrenérgico não tenham sido modificados pela obesidade no presente estudo, algumas pesquisas sugerem que a disfunção cardíaca encontrada em animais obesos pode ter relação com outros componentes da via de sinalização β -adrenérgica. Os autores relatam a concentração de AMPc e a fosforilação da PKA como possíveis responsáveis pelas alterações no trânsito de cálcio miocárdico^(144,145,150). Pesquisa realizada por Carroll et.al.⁽¹⁵⁴⁾ indica que a disfunção miocárdica está relacionada aos componentes que se localizam pós-complexo β -receptor/proteína $G_s\alpha$, indicando menor atividade da adenilato ciclase. Outro estudo, observou diminuição na atividade da PKA nos animais *ob/ob*, sugerindo desta forma que as possíveis alterações na performance cardíaca podem ter associação com a atividade

desta proteína e/ou sua fosforilação, alterando desta maneira o transiente de Ca^{+2} cardíaco, com consequente disfunção miocárdica⁽¹⁵³⁾.

Importante destacar que a investigação do sistema β -adrenérgico na obesidade motivou-se pelos resultados encontrados por Lima-Leopoldo⁽⁹³⁾, que indicou diminuição da expressão do fosfolambam fosforilado (pPLB) em animais alimentados com dieta hiperlipídica por 15 e 30 semanas. Esses achados referem-se ao pPLB na serina 16, que por sua vez, é dependente da fosforilação pela concentração de AMPc via PKA estimulada pela cascata de sinalização β -adrenérgica. Nesta via, os resultados encontrados por Minhas et. al.⁽¹⁵³⁾ também destacam redução da fosforilação do PLB, devido à menor fosforilação da PKA em animais geneticamente obesos.

Desta maneira, trabalhos futuros são necessários para avaliar a influência da obesidade induzida por dieta sobre os componentes da via β -adrenérgica localizados pós-complexo β -receptor, bem como, mensurar os níveis de catecolaminas em modelos de obesidade por dieta hiperlipídica insaturada.

5 CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica insaturada, por 15 semanas, não promove alterações na expressão protéica dos receptores β -adrenérgicos, β -1 e β -2 e proteína $G_s\alpha$.

6 REFERÊNCIAS

1. Korner J, Arone LJ. The emerging of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(5):565-70.
2. Mathew B, et al. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am. J. Med. Sci.* 2007; 334(1):23-30.
3. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2002; 105(24):2923-28.
4. O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am. J. Surg.* 2002; 184(6B):4S-8S.
5. Wong CY. et al. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation.* 2004; 110(19):3081-87.
6. World Health Organization. Obesity and Overweight. Geneva: WHO. [access 2014 Jun 20]. Available from: <http://www.who.int/en/>
7. Kac G, Velasques-Melendez G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cad. Saúde Pública.* 2003; 19(1):S4-S5.
8. Monteiro CA. et al. The nutrition transition in Brazil. [Eur. J. Clin. Nutr.](#) 1995; 49(2):105-13.
9. Francischi RP. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev. Nutr.* 2000; 13(1):17-28.
10. Francischi RP, Pereira LO, Lancha JRAH. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev. Paul. Educ. Fís.* 2001; 15(2):117-40.
11. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
12. Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutr. Rev.* 1992; 5(10): 283-90.
13. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2522-25.

14. Malnick SD, knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006; 99(9): 565-79.
15. Poirier P. et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006; 26(5): 968-76.
16. Fontaine KR. et al. Years of Life lost due to obesity. *JAMA*. 2003; 289(2):187-93.
17. Hu FB. et al. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351(26): 2694-03.
18. Olshansky S. et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N. Engl. J. Med*. 2005; 352(11): 1138-45.
19. Pardo SMC. et al. Adult obesity and number of years lived with and without cardiovascular disease. *Obesity*. 2006; 14(7): 1264-73.
20. Wilson PW. et al. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk. *Arch. Intern. Med*. 2002; 162(16): 1867-72.
21. Alpert MA. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am. J. Cardiol*. 1995; 76 (16): 1194-97.
22. Scaglione R. et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Eur. Heart. J*. 1992; 13(6): 738-42.
23. Björntorp P. Classification of obese patients and complications related to the distribution of surplus fat. *Am. J. Clin. Nutr*. 1987; 45(5): 1120-25.
24. Klein S. et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation*. 2004; 110(18): 2952-67.
25. Pereira LO, De Francischi RP, Lancha JRAH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 2003; 47(2): 111-127.
26. Dong F. et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J. Endocrinol*. 2006; 188(1):25-36.
27. Ren, J. et al. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese zucker rat hearts. *J. Biomed. Sci*, 2000; 7(5): 390-400.
28. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006; 48(1): 65-72.

29. Relling DP et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J. Hypertens.* 2006; 24(3): 549-61.
30. Fitzgerald SM et al. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 281(2): R547-R552.
31. Carroll JF et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and neurohumoral activity in a new animal model of obesity. *Am. J. Physiol.* 1996; 271(1): H373-H378.
32. Du toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 2005; 100(4): 346-54.
33. Ren J et al. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity.* 2008; 16(11): 2417-23.
34. Leopoldo AS et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can. J. Cardiol.* 2010; 26(8): 423-29.
35. Leopoldo AS et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2A in myocardial dysfunction induced by obesity. *J. Cell. Physiol.* 2011; 226(11):2934-42.
36. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: OPIE, L. H. *The Heart. Physiology from cell to circulation.* 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998; 209-231.
37. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002; 415(6868): 198-205.
38. Lee S et al. Total beta-adrenoceptor deficiency results in cardiac hypotrophy and negative inotropy. *Physiol Res.* 2010; 59(5): 679-689.
39. Saucerman JJ, McCulloch AD. Cardiac beta-adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1080: 348-361.
40. Barros RDEA, Okoshi MP, Cicogna AC. Beta-adrenergic pathway in healthy and hypertrophied hearts. *Arq. Bras. Cardiol.* 1999; 72(5): 641-56.
41. Lymperopoulos A. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Front Physiol.* 2013; 4(4): 240.
42. Zerkowski HR et al. Human myocardial beta-adrenoceptors: demonstration of both beta 1- and beta 2-adrenoceptors mediating contractile responses to beta-agonists on the isolated right atrium. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 1986; 332(2): 142-47.

43. Gauthier C et al. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 1996; 98(2): 556-62.
44. Heubach JF et al. Physiological antagonism between ventricular beta1-adrenoceptors and alpha1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136(2): 217-29.
45. Zhao XL et al. The α_1 -subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 198: 166-173.
46. Gerhardstein BL et al. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry.* 1999; 38(32): 10361-10370.
47. Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action and role in cardiac function. *Physiol. Rev.* 1998; 78(4): 921-47.
48. Sulakhe PV, Vo XT. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli. *Mol. Cell. Biochem.* 1995; 149-150: 103-126.
49. Marx SO et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000; 101(4): 365-76.
50. Brum PC et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2006; 78(3): 485-503.
51. Altan VM et al. The influence of diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes. *Heart. Fail. Rev.* 2007; 12(1): 58-65.
52. Brixius K et al. Increased Ca^{2+} -sensitivity of myofibrillar tension in heart failure and its functional implication. *Basic Res. Cardiol.* 2002; 97(1): I111-I117.
53. Van der Velden J et al. Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 2003; 57(1): 37-47.
54. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003; 4(7): 566-77.
55. Neer EJ, Claphan DE. Roles of G-protein subunits in transmembrane signalling. *Nature.* 1988; 333(6169): 129-34.

56. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62(5): 971-974.
57. Evora PR, Nobre F. The role of G-proteins in the pathophysiology of the cardiovascular diseases. *Arq. Bras. Cardiol.* 1999; 72(2): 209-29.
58. Adams JW, Brown JH. G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene.* 2001; 20(13): 1626-3.
59. Dincer UD. et al. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes.* 2001; 50(2): 455-461.
60. Moniotte S et al. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation.* 2001; 103(12): 1649-55.
61. Salzar NC, Chein J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1768(4): 1006-1018.
62. Lamba S, Abraham WT. Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure. *Heart. Fail. Rev.* 2000; 5(1): 7-16.
63. Fischer V et al. Heart adrenoceptor gene expression and binding sites in the human failing heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1148: 400-408.
64. Carroll JF, Kyser CK, Martin MM. Beta-Adrenoceptor density and adenylyl cyclase activity in obese rabbit hearts. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26(5): 627-632.
65. Carroll JF et al. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension.* 1997; 30(6): 1376-81.
66. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academy Press, 1996.
67. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics.* 1996; 34(3): 389-398.
68. Nascimento AF et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in *Wistar* rats. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2008; 52(6): 968-74.
69. Boustany-kari CM et al. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int. J. Obes. (Lond).* 2007; 31(11): 1652-1659.
70. Levin BE. et al. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 279(4): R1357-R1364.

71. Nascimento AF et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol. Res.* 2008; 41(3): 253-259.
72. Dobrian AD et al. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2000; 35(4): 1009-1015.
73. Akiyama T et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Dianetes. Res. Clin. Pract.* 1996; 31(1-3): 27-35.
74. Dourmashkin JT et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int. J. Obes.* 2005; 29(11): 1368-78.
75. Woods SC et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 2003 ; 133(4):1081-1087.
76. Nivoit P et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2009; 52(6):1133-42.
77. De Assis AM et al. High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats. *Exp. Biol. Med.* 2009; 234(11):1296-1304.
78. Matthews DR et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28(7): 412-419.
79. Matsubara LS et al. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq. Bras. Cardiol.* 2006; 86(2): 126-130.
80. Matsubara LS et al. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000; 279(4): H1534-H1539.
81. Cicogna AC et al. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am. J. Med. Sci.* 2000; 320(4): 244-248.
82. Krebs HA, Henseleit K. Studies on urea formation in the animal organism. Hoppe-Seylers. *Z. Physiol. Chem.* 1932; 210: 33-66.
83. Yamato T et al. Postrest contraction in the ventricular papillary muscle of spontaneously diabetic WBN/Kob rat. *Exp. Anim.* 2001; 50(1): 19-31.
84. Urthaler F et al. Maximal twitch tension in intact length-clamped ferret papillary muscles evoked by modified postextrasystolic potentiation. *Circ. Rev.* 1988; 62(1): 65-74.
85. David JS et al. Interaction of protamine with alpha- and beta-adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology.* 2002; 96(2): 521.

86. Pinotti MF et al. Influences of rich in saturated and unsaturated fatty acids diets in rat myocardium. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007; 88(3): 346-353.
87. Rolim NP et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiol. Genomics.* 2007; 29(3): 246-52.
88. De Tomasi LC et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 87(6): 426-431.
89. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
90. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J. Am. Stat. Assoc.* 1977; 72: 469-478.
91. Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 4. ed. New Jersey: Prelice-Hall, 1998. 816p.
92. Leopoldo AS. Influência do tempo de exposição à obesidade sobre a função cardíaca de ratos. [Tese]. Botucatu. Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista; 2010.
93. Lima-Leopoldo AP. Influência do tempo de exposição à obesidade sobre a expressão gênica e proteica do sistema regulador do trânsito de cálcio miocárdico. [Tese]. Botucatu. Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista; 2010.
94. Silva DCT. Influência da atividade das metaloproteinases 2 e 9 na diminuição do colágeno tipo I miocárdico em ratos obesos. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista; 2013.
95. Campos DHS. Influência da oxidação de glicose sobre a função miocárdica de ratos obesos. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista; 2010.
96. Lima-Leopoldo AP. et. al. Influência de prolongados períodos de obesidade sobre a expressão gênica miocárdica. *Arq. Bras. Cardiol.* 2013; 100(3): 229-237.
97. Nascimento BT. et. al. Alterações vasculares em ratos obesos por dieta rica em gordura: Papel da via L-arginina/NO endotelial. *Arq. Bras. Cardiol.* online, 2011.
98. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes.* 2005; 29(11):1368-78.
99. Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med.* 2006; 231(3):282-7.

100. Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289(1):R181-6.
101. Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat. *Am J Physiol*. 1983; 244(3):R347-55.
102. White et. al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013; 57/5.
103. Duarte et. al. High-fat diet and secretory capacity of insulin in rats. *Re. Nutr. Campinas*. 2006; 19(3): 341-348.
104. Lin S, Thomas TC, Storlien LH and Huand XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BI/6Jmice. *Int J Obes*. 2000;24: 639-46.
105. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal model. *Nutri. Res. Rev*. 2010; 23(2): 270-99.
106. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996; 31(1-3):27-35.
107. Lima-Leopoldo AP. et. al. Disfunção miocárdica e alterações no trânsito de cálcio intracelular em ratos obesos. *Arq. Bras. Cardiol.* , 2011; 97(3):232-40.
108. Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism*. 2008; 57(3):313-20.
109. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr*. 2000; 84(4):417-27.
110. Jequier E. Pathways to obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 2002; 26 suppl.2: S12-7.
111. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation*. 2003; 108(13):1546-51.
112. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med*. 2005; 56:45-62.
113. Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci*. 2001; 101(5):499-506.

114. Sun X, Pan H, Tan H, Yu, Y. High free fatty acids levels related with cardiac disfunction in obese rats. *Diabetes research and clinical practice*. 2012; 251-259
115. Schaalan M, El-Abhar HS, Barakat M, El-Denshary ES. Westernized-like-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *J Diabetes Complications* 2009; 23(3):199-208.
116. Stark AH, Timar B, Madar Z. Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. *Eur J Nutr*. 2000; 39(5):229-34.
117. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes*. 2005; 29(10):1175-83.
118. Ceddia RB, William WN Jr, Curi R. The response of skeletal muscle to leptin. *Front Biosci*. 2001; 6:D90-7.
119. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens*. 2005; 18(5):692-8.
120. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-9.
121. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 106(2):165-9.
122. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest*. 1988; 81:435-41.
123. Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone*. 2007; 8(7):S30-42.
124. Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL. Moderate GLUT4 overexpression improves insulin sensitivity and fasting triglyceridemia in high-fat diet-fed transgenic mice. *Diabetes*. 2013; 62(7): 2249-58.
125. Garvey WT, Maianu L, Hueckstead TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest*. 1991; 87:1072-108.
126. Ikemoto S, Thompson KS, Takahashi M, Itakura H, Lane MD, Ezaki O. High fat diet-induced hyperglycemic: prevention by low level expression of a glucose transporter

- (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:3096–3099.
127. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res*. 2007; 101(6):545-59.
 128. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weightreduced subjects. *Nat Med*. 1995; 1(11):1155-61.
 129. Young Sun Kang MD. Obesity associated hypertension: New insights into mechanism. 2013; 11: 46-52.
 130. Considine, R. V., M. Sinha, M. Heiman, A. Kriauciunas, T. Stephens, M. Nyce, J. Ohannesian, and C. Marco. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med*. 334:292-295.
 131. Houseknecht K. L., S. N. Flier, E. U. Frevert, R. C. Frederich, J. S. Flier, and B. B. Kahn. 1996b. Leptin secretion correlates with adipocyte size in genetic and dietary obesity. *Diabetes* 45: (Suppl. 2)41A (Abstr.).
 132. Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 2004; 145(6):2613-20.
 133. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996; 98(5):1101-6.
 134. Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 2000; 71(3):187-95.
 135. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982; 243(6):H941-7.
 136. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 2006; 29(1):81-90.
 137. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2548-56.
 138. Garcia, J.A.D.; Icerpi, E.K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. *Arq. Bras. Cardiol*. 2008; 90(6): 443-450.

139. Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res.* 1997; 34(1):3-24. 158.
140. McNulty PH, Jacob R, Deckelbaum LI, Young LH. Effect of hyperinsulinemia on myocardial aminoacid uptake in patients with coronary artery disease. *Metabolism.* 2000; 49(10):1365-9.
141. Young LH, Dahl DM, Rauner D, Barrett EJ. Physiological hyperinsulinemia inhibits myocardial protein degradation in vivo in the canine heart. *Circ Res.* 1992;71(2):393-400.
142. Carnevalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(4):419-25.
143. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2004; 63(3):403-13.
144. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008; 214(2):316-21.
145. Leifheit-Nestler et. al. Importance of leptin signaling and signal transducer and activator of transcription-3 activation in mediating the cardiac hypertrophy associated with obesity. *J Trans Med.* 2013; 11: 170.
146. Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S and Karmazyn, M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Circ. Res.* 2008; 77(1) 64-72.
147. Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S and Karmazyn, M. mTOR mediated RhoA/ROCK-dependent leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 2011; 352: 99-108.
148. Cabrol P, Galinier M, Fourcade J, Verwaerde P, Massabuau P, Tran MA, et al. Functional decoupling of left ventricular beta-adrenoreceptor in a canine model of obesity-hypertension. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1998; 91(8): 1021-4.
149. Dincer UD. Cardiac β -adrenoreceptor expression is markedly depressed in Ossabaw swine model of cardiometabolic risk. *Int. J Gen Med.* 2011; 4: 493-9.
150. Zouhal H, Jabbour G, Youssef H, Flaa A, Moussa E, Groussard C, Jacob C. Obesity and catecholamine responses to maximal exercise in adolescent girls. *Eur J App Physiol.* 2010; 110: 247-54.

151. Jabbour G, Lemoine-Morel S, Casazza AG, Hala Y, Moussa E and Zouhal H. Catecholamine response to exercise in obese, overweight, and lean adolescent boys. 2011
152. Young JB, Daly PA, Uemura K, Chaouloff F. Effects of chronic lard feeding on sympathetic nervous system activity in the rat. *Am J Physiol.* 1994; 267(5Pt2): R1320-8.
153. Minhas MK et. al. Leptin repletion restore depressed β -adrenergic contractility in *ob/ob* mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol.* 2005; 565(2): 463–474.
154. Carroll, J. F. Post- β -receptor defect in isolated hearts of obese-hypertensive rabbit hearts. *Int. J. Obes Relat Metab Disord.* 1999; 23(8): 863-6.